

MONOGRAFIA

BIOLOGIA DEL ENVEJECIMIENTO

Barona Cabal, María Isabel

RESUMEN

El envejecimiento es un tema de interés multidisciplinario. Su etio-patogénesis se ha tratado de dilucidar desde hace muchos años, y por ende la manera de retardar su aparición y prevenir la manifestación de enfermedades degenerativas y, en ocasiones, mortales que se hacen más frecuentes a medida que el organismo se envejece.

Múltiples teorías se han desarrollado. En esta revisión se habla de algunas de ellas y de aspectos recientes relacionados con la Biología molecular del envejecimiento.

Palabras Clave: Envejecimiento, Biología Molecular.

INTRODUCCION

El envejecimiento se define como el deterioro progresivo de la capacidad de un organismo para responder adecuadamente ante los diferentes cambios ambientales.¹

Hasta la fecha, los factores que determinan la vida media de un organismo y la tasa de envejecimiento, no se han dilucidado totalmente.

El desarrollo de técnicas de biología molecular, aplicables a los sistemas vivos, ha capacitado a los científicos para tratar de entender mejor desde los síntomas descriptivos que se manifiestan con el envejecimiento, hasta la identificación de los procesos bioquímicos que finalmente determinan la duración de la vida.

TEORIAS SOBRE EL ENVEJECIMIENTO

Se han desarrollado con el tiempo diferentes teorías que procuran explicar el por qué de la senectud, y los estudiosos esperan que todos sus esfuerzos los conduzcan a encontrar la manera de prolongar el promedio de vida y así, retardar o

prevenir patologías como el cáncer, enfermedades cardíacas y otras, a las cuales el organismo llega a ser muy vulnerable a medida que envejece.

Teoría Evolutiva

Michael Rose y otros investigadores² explican el envejecimiento como un proceso genéticamente controlado, mediante "gerontogenes", según el cual, los individuos viven hasta que cumplen sus funciones de reproducción, pero a través de todas las generaciones, ocurren diferentes mutaciones genéticas que, por el fenómeno de selección natural, serán conservadas sólo aquellas que conlleven un mejoramiento y ventajas para que continúe la reproducción y por el contrario, serán eliminadas las que sean invariablemente letales antes de alcanzar la madurez sexual. Sin embargo, algunos genes peligrosos podrían persistir si sus efectos dañinos no se manifiestan sino después de haberse iniciado la reproducción y tendrían funciones antagónicas, fenómeno conocido como pleiotropía antagónica; tal es el caso de los genes que determinan la síntesis de hormonas reproductoras. Por ejemplo, los estrógenos requeridos para la fertilidad pueden a su vez predisponer a la malignización del tejido mamario en la mujer.

Teoría de la Tasa de Vida

Se basa en la relación que existe entre el gasto metabólico y el promedio de vida.¹

Aunque la vida media de individuos que pertenecen a la misma especie puede variar significativamente, para algunos³ es evidente que el gasto metabólico total durante la vida es constante para cada especie.

Loeb y Northrup⁴ y otros investigadores⁵ observaron que variaciones inducidas experimentalmente en la tasa metabólica de algunos insectos, principalmente mediante variaciones de temperatura, podrían afectar el promedio de vida. Estos hallazgos han llevado a postular⁶ que dos factores determinan la duración de la vida:

- El potencial metabólico o trabajo metabólico total hecho durante la vida, el cual está determinado genéticamente y
- la tasa del metabolismo.

Aunque la teoría de la tasa de vida parece identificar correctamente el gasto metabólico como un factor que influye en la velocidad del envejecimiento, no identifica su causa.

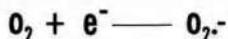
María Isabel Barona Cabal MD
Dermatóloga, Docente adjunto Sección de Dermatología
Universidad del Valle, Cali

Teoría de los Radicales Libres

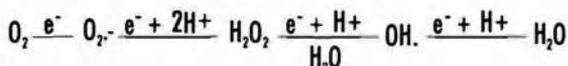
Estas moléculas, producidas durante el curso de vida normal, pueden contribuir al proceso de envejecimiento. Fue Harman⁷ en 1956 quien propuso esta teoría, y desde entonces numerosos trabajos se han desarrollado alrededor de ella.

Los radicales libres son átomos, iones o moléculas que contienen un electrón impar en su orbital más externo.^{8,9}

Algunos elementos, cual el oxígeno, pueden aceptar fácilmente electrones únicos de transferencia,⁸ como aquellos cedidos por metales de transición encontrados en el sitio activo de muchas enzimas (oxidasas y oxigenasa), para producir radicales libres altamente reactivos.¹⁰ (Tabla No. I).



Una vez formado, el radical libre superóxido puede continuar hacia reducciones secundarias, para producir otras especies activas de oxígeno, como el peróxido de hidrógeno H₂O₂, y el radical libre hidroxilo OH, muy reactivos.^{9,11}



Estos radicales libres de oxígeno se forman durante el metabolismo normal de las células, como durante la fosforilación oxidativa, y el sistema enzimático citocromo mitocondrial.⁹

La injuria celular asociada con radicales libres ocurre en situaciones en las cuales los sistemas antioxidantes son sobresaturados, o están alterados.⁹

Ciertos cambios en el ambiente también pueden afectar la exposición de sistemas biológicos a radicales libres, como la radiación ionizante, algunos fotosensibilizadores, la quema de algunas sustancias orgánicas, etc.^{9,12}

La mayoría de los radicales libres de interés biológico tienden a ser extremadamente reactivos e inestables; como resultado tienen una vida media muy corta.¹³

Por su reactividad, en su mayoría, los radicales libres existen en muy bajas concentraciones y no viajan lejos de su sitio de formación,¹⁴ pero pueden reaccionar con otros compuestos, no radicales, para producir nuevos radicales libres, y estos segundos sí pueden tener efectos biológicos distantes del sitio donde se formó el primer radical.⁹

Cuando dos radicales libres reaccionan, uno con otro, una molécula estable puede formarse y esto explica la terminación eventual de reacciones en cadena inducidas por radicales libres.⁹

Los radicales libres pueden alterar diferentes componentes celulares: en la membrana celular, la oxidación de lípidos y proteínas puede afectar la permeabilidad e integridad de la membrana plasmática y de membrana que rodean organelas internas; en la mitocondria su DNA y membranas son particularmente propensas a la oxidación y llevarían a la célula a déficits de energía; muchas enzimas pueden ser inactivadas en sus sitios activos, al igual que muchas proteínas extra e intracelulares; el DNA molecular que constituye los cromosomas puede afectarse e interferir en la producción de proteínas.^{2,9,15} (Tabla II).

O ₂ HO ₂ H ₂ O ₂ OH ROO	Anión Radical Radical hidroperoxil Peróxido de hidrógeno Radical hidroxilo Radical peróxido
---	---

Lípidos	Peroxidación de ácidos grasos poli-insaturados en organelas, membranas plasmáticas.
Proteínas	Oxidación de enzimas que contienen sulfhidrilos inactivación, aumenta el contenido de derivados carbonilos en las proteínas (eritrocitos humanos y fibroblastos cutáneos de donantes humanos envejecidos).
Carbohidratos	Depolimerización polisacárida
Acidos Nucleicos	Hidroxilación de las bases, entrecruzamientos, rompimiento de las bandas de DNA causando mutación e inhibición de proteínas, nucleótidos y síntesis de ácidos grasos.

Mecanismos celulares protectores contra el daño producido por radicales libres

Las células contienen una variedad de defensas, para prevenir o reparar el daño molecular causado por los radicales libres y cuando éstas se alteran o se saturan, se pone de manifiesto el daño celular, el envejecimiento y diferentes enfermedades.²

Antioxidantes²

Enzimas: Superóxido dismutasa: Convierte el radical superóxido a peróxido de hidrógeno.

Glutation peroxidasa y catalasa: convierten el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular.

Vitamina E y betacarotenos: Reaccionan con radicales libres, son lipo-solubles y pueden proteger las membranas.

Acido úrico y vitamina C: Reaccionan con radicales libres en el citoplasma.

Quelantes de metales: Previenen la formación de hierro, cobre y otros metales de transición de reacciones de oxidación catalizantes.

Sistemas reparativos²

Reparación de proteínas:

Proteinasas: Rompen proteínas oxidadas.

Proteasas: Cortan los productos de la actividad de las proteinasas.

Peptidasas: Desechan productos de la actividad de proteasas, los aminoácidos pueden reciclarse para hacer nuevas proteínas.

Reparación de lípidos:

Fosfolipasas: Cortan las partes oxidadas de los lípidos en las membranas.

Acetiltransferasas: Se piensa que reemplazan ácidos grasos alterados de los lípidos.

Glutation peroxidasa y transferasa: Ayudan a reparar ácidos grasos oxidados sin descartar grandes segmentos de las membranas.

Reparación de DNA:

Exonucleasas y endonucleasas: Cortan segmentos afectados de DNA.

Glicosilasas y polimerasas: Llenan los vacíos dejados por exonucleasas y endonucleasas.

Ligasa: Sella los segmentos reparados.

Antioxidantes Exógenos

El tocoferol, ascorbato y ceruloplasma son antioxidantes no enzimáticos.¹

El tocoferol es hidrofóbico, se encuentra intercalado en las membranas del retículo endoplásmico y de la mitocondria.^{1,16,17} El ascorbato juega un papel importante en la eliminación del radical superóxido y protege en dosis altas contra la peroxidación de lípidos.^{1,2}

El ceruloplasma es una proteína que contiene cobre, abundante en los tejidos y es capaz de oxidar hierro, previniendo la formación de radicales OH, e inhibe la peroxidación de lípidos catalizada por hierro.^{1,18}

Sin embargo, cuando se trata de prolongar la vida administrando antioxidantes el éxito ha sido muy limitado.^{1,18,5} Una razón por la cual fallan es porque su absorción en el cuerpo disminuye cuando se ingieren dosis altas^{1,19} y además, tienden a disminuir la actividad de las defensas endógenas enzimáticas.^{1,5}

La relación entre la tasa de producción de radicales libres y el nivel de defensas contra ellas parece representar un equilibrio dinámico, que puede sufrir alteraciones relacionadas con la edad afectando la capacidad de síntesis celular y disminuyendo la tasa del metabolismo.⁵

Alteraciones en las Proteínas

Una de las teorías del envejecimiento está relacionada con los cambios que se pueden suceder en varios pasos de la síntesis de proteínas, incluyendo modificaciones proteicas, del RNA-mensajero (RNAm), o en la estructura y función del DNA.²⁰

Una de las modificaciones más importantes es la glicosilación no enzimática, cuyo estado inicial es conocido como la reacción de Maillard, y se sabe que ocurre en varias proteínas del cuerpo humano.^{1,20} Cerami y col.²¹ descubrieron que este proceso sucede más fácilmente en pacientes diabéticos, con niveles sanguíneos elevados de glucosa y es responsable de la formación de hemoglobina glicosilada A1c, que tiene una afinidad alterada por el oxígeno y su nivel es proporcional a la concentración de glucosa sanguínea. Estos productos se forman cuando se condensa un grupo aldehído del azúcar con los amino de las proteínas. Se ha denominado AGE al producto final de glicosilación avanzada, y se ha encontrado que se acumula en la mielina de los nervios periféricos de

diabéticos humanos^{1,22} lo que ayudaría a explicar las patogénesis de la neuropatía diabética periférica.

Los compuestos resultantes de la glicosilación no enzimática ejercen efectos adversos en la célula. Por ejemplo, el colágeno glicosilado no enzimáticamente se une a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) de manera similar a lo que ocurre en lesiones humanas ateroscleróticas.²³ Otras proteínas glicosiladas de igual manera, se ha observado que se acumulan en el lente ocular y en el colágeno humano con la edad.^{24,25} Otros efectos deletéreos son alteraciones en el recambio proteico, entrecruzamientos y aumento de la rigidez tisular, respuesta inmune alterada e interferencia en las funciones fisiológicas.^{20,24,25}

Otro cambio importante relacionado con la edad en las propiedades de las proteínas es la racemización de aminoácidos,^{20,26} consistente en la conversión de la forma L de los aminoácidos de las proteínas a su isómero D, que ocurre espontáneamente *in vivo* y sus consecuencias podrían contribuir al envejecimiento.¹

La racemización de aminoácidos puede afectar la estructura secundaria o terciaria de la molécula, su vida media y la tasa de recambio. La temperatura parece ser el factor principal que influye en este fenómeno.¹

Se ha observado acumulación de ácido D-aspartico con la edad en el núcleo ocular humano y en la materia blanca del cerebro humano.^{27,28}

El envejecimiento se asocia también con una disminución en la síntesis de proteínas, demostrada *in vivo* e *in vitro* utilizando diferentes cepas de ratones,²⁹ al parecer en más de un 70%. Sin embargo, a pesar de esto, el contenido de proteínas por célula no se afecta, porque ocurre una degradación proteica proporcional.²⁹

El proceso de elongación de la cadena peptídica está notoriamente disminuido, y esto podría explicar la reducción en la eficiencia de transcripción del RNAm que sucede con la edad.²⁰

Cambios en el RNA relacionados con la edad

Los cambios relacionados con la síntesis total de RNA y la edad han dado lugar a la publicación de reportes muy controvertidos.²⁰ Estos estudios, al igual que los hechos sobre el DNA, se han facilitado por los hallazgos obtenidos con cultivos celulares *in vitro*.

El estudio de la senectud celular *in vitro* cobró gran auge desde los trabajos de Hayflick y Moorhead³⁰ sobre cultivos de fibroblastos pulmonares de embriones; se observaron que estas células después de un "explant", (fase I), pasan por un período de rápida proliferación, (fase II), luego la reproducción disminuye y las células empiezan a mostrar cambios degenerativos, (fase III), y finalmente un estado de profunda desorganización intracelular y disminución rápida de la densidad celular, (fase IV). Además demostraron que la vida media varía inversamente con la edad del donante, obteniéndose 35 a 63 poblaciones duplicadas de los fibroblastos fetales y solo 14 a 29 de fibroblastos de adultos.³¹

Utilizando dichos cultivos, algunos investigadores han encontrado que la síntesis de RNA-total disminuye a medida que aumenta la población duplicada de fibroblastos cultivados y

este efecto correlaciona directamente con la edad del paciente donante.²⁰ Esta reducción en la síntesis de RNA-total parece ser estar balanceada por una reducción proporcional en la degeneración del RNA.³¹

El contenido celular de RNAm, diferente del RNA total, puede estar alterado con el envejecimiento.³² Los cambios en los niveles de RNAm con la edad generalmente se asocian a una alteración en la tasa de transcripción, aunque un cambio en la estabilidad del RNAm relacionado con la edad no puede ser excluido.^{20,32}

Otra consideración importante es la reducción en el transporte de RNAm desde el núcleo al citoplasma que ocurre con la edad, el cual es independiente de energía.³³

Alteraciones del DNA relacionadas con la edad

El envejecimiento celular se asocia con alteraciones significantes en las proteínas de enlace del DNA, que podrían explicar la disminución en la transcripción global de cromatina que sucede con la edad.^{20,34}

Varios estudios han reportado rupturas en el DNA de una o doble banda con la edad.^{2,20,35} Sin embargo, estas observaciones no han sido consistentemente reproducidas, posiblemente por el uso de técnicas y metodologías diferentes.^{20,36}

La capacidad de reparación del DNA después de estímulos como la irradiación por luz ultravioleta, se encuentra disminuida o en algunos casos sin alteraciones con el envejecimiento.^{20,37}

Los investigadores han encontrado de gran interés analizar las alteraciones en el DNA mitocondrial relacionadas con el envejecimiento, porque la mitocondria es responsable de gran parte de la energía celular necesaria para el metabolismo y su capacidad está reducida con la edad.² Además la mitocondria es la fuente principal generadora de radicales libres, y su DNA es bastante vulnerable al daño oxidativo, porque carece de proteínas, como la histona, que protegen al DNA.²

El DNA mitocondrial está mínimamente protegido por enzimas que recientemente se ha demostrado que cortan y reemplazan segmentos oxidados en el DNA nuclear. En 1989 Linnane y col³⁸ desarrollaron una hipótesis del envejecimiento relacionada con las mutaciones del DNA mitocondrial, (DNAmit) basándose en los déficits metabólicos del DNA mutante de la levadura unicelular, *Saccharomyces cerevisiae* y en observaciones sobre enfermedades del ser humano atribuibles al DNAmit mutante. Esta teoría refiere que en divisiones celulares sucesivas durante las cuales hay replicación del DNAmit mutante en las células hijas, la segregación de células producirá algunas con DNAmit normal predominante, otras con DNAmit predominantemente mutado y otras con diferentes cantidades de ambas. La acumulación en el tiempo, de células bioenergéticamente defectuosas, sería el factor clave del envejecimiento.

Resultados similares han sido encontrados³⁹ en tejido cardíaco humano y en algunos animales, como ratones.

Por lo tanto, se ha considerado que las mutaciones acumulativas del DNAmit podrían ser relevantes para una teoría del envejecimiento y la ocurrencia de ciertas enfermedades degenerativas específicas de tejidos como músculo estriado y tejido natural.

Genética

En los cultivos de fibroblastos, como ya se dijo, las células a medida que envejecen pierden la capacidad de duplicarse, porque no sintetizan más DNA, lo cual significa para algunos investigadores, cambios en la expresión sistemática de los genes relacionados con la expresión de inhibidores de la proliferación.^{20,40} La represión selectiva del gen proliferativo *c-fos* en las células envejecidas, mediante el bloqueo específico de su transcripción, puede explicar parcialmente por qué las células cesan su proliferación.⁴¹

Al parecer, hay un inhibidor común de la duplicación celular, que se activa en las células envejecidas y está quiescente en las células jóvenes, bien sea por privación sérica o por la alta densidad celular de estas últimas.^{20,42} El gen productor del retinoblastoma p110Rb, un inhibidor de la proliferación celular, podría estar involucrado en la senectud de las células, puesto que se ha evidenciado que su inactivación permite que las células envejecidas sinteticen DNA.⁴²

La Interleucina-1 alfa (IL-1) parece ser otro factor comprometido en el envejecimiento celular.⁴³ Su contenido es alto en las células endoteliales humanas cultivadas, en contraste con las células jóvenes o inmortalizadas. Cuando se inactiva este gen, las células no progresan hacia el envejecimiento.⁴³ Otros genes han sido reconocidos en el envejecimiento celular,⁴⁴ y es probable que una cascada de genes sea activada o suprimida durante este proceso.

Un hallazgo importante fue el reconocimiento hecho por Sugawara y col,⁴⁵ de que los factores controladores del envejecimiento se encuentran ubicados en el cromosoma 1, aunque otros factores se localizarían en genes diferentes como el del retinoblastoma. Las anteriores observaciones apoyan la base genética para el envejecimiento celular.

A pesar de todos los progresos descritos por los investigadores para explicar el envejecimiento y tratar de hacerlo más lento, no hay un concepto unificado que logre conciliar las diversas teorías. Hoy se cree que no hay una sola causa, sino múltiples factores que interactúan, muchos de ellos genéticamente controlados, pero influenciados por procesos externos o ambientales.

SUMMARY

Aging has been a subject of multidisciplinary interest. Etiopathogenesis of aging had been studied since several years ago, and also the different ways to prevent the degenerative diseases that, in certain cases, are lethal, and that increase while the body is advancing in age.

Several theories had developed around. I resumed some of the theories proposed and discussed recent aspects related with the molecular biology of aging.

Key Words: Aging, Molecular Biology.

BIBLIOGRAFIA

1. Balin AK, Allen RG. Mechanisms of Biologic Aging. En: *The Aging Skin*. Dermatologic Clinics. WB Saunders Co., Julio 1986, 437-358.
2. Rusting Rickil. Why do we age. *Scientific American*. 1992; 267(6): 130-141.
3. Sohal RS. The rate of living theory: A contemporary interpretation. In: Collatz KG, Sohal RS (Eds). *Comparative Biology of Insect Aging. Strategies and Mechanisms*. Berlin, Springer-Verlag, 1986.
4. Loeb J, Northrup JH. On the influence of food and temperature on the duration of life. *J Biol Chem* 1917; 32: 103-121.
5. Sohal RS, Allen RG. Relationship between metabolic rate, free radicals, differentiation and aging: An unified theory. In Woodhead AV, Blackett AD, Hollaender A (eds): *The Molecular Biology of Aging*. New York, Plenum Press, 1985.
6. Pearl R. *The Rate of Living*. New York, Knopf Press, 1928.
7. Harman D: *Aging: A theory based on free radical radiation chemistry*. *J Gerontol* 1956; 11: 298-300.
8. Pryor WA. (ed): *Free Radicals in Biology*. Volume 1. New York, Academic Press, 1976.
9. Southorn PA, Powis Garth DP. Free Radicals in Medicine I. Chemical Nature and Biological Reactions. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 381-389.
10. Hill HAC: Oxygen, oxidases and the essential trace metals. *Philos Trans R Soc Lon (Biol)* 1975; 294: 119-128.
11. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605.
12. Pryor WA: Free Radical Biology: xenobiotics, cancer and aging. *Ann NY Acad Sci* 1982; 393: 1-22.
13. Pryor WA. Oxy-radicals and related species, their formation lifetimes and reactions. *Annu Rev Physiol* 1986; 48: 657-667.
14. Hutschinson F. The distance that a radical formed by ionizing radiation can diffuse in a yeast cell. *Radiat. Res* 1957; 7: 473-483.
15. Barber AA, Berheim F. Lipid peroxidation: its measurement, occurrence, and significance in animal tissues. *Adv Gerontol Res* 1967; 2: 355-403.
16. L. Guilly Y, Simon M, Lenoir P, et al: Long term culture of human adult liver cells: Morphological changes related to in vitro senescence and affect of donors age on growth potential. *Gerontologia* 1973; 19: 303-313.
17. Cristofalo VS, Kritchevsky D: Cell size and nucleic acid content in the diploid human cell line W-38 during aging. *Med Exp* 1969; 19: 313-320.
18. Gutteridge JML, Richmond R, Halliwell B: Oxygen free radicals and lipid peroxidation. Inhibition by protein aeruloplasm. *F.E.B.S. Lett* 1980; 112: 269-272.
19. Cosowsky MS, Kelleher J, Walker BE et al: Intake and absorption of tocopherol. *Ann NY Acad Sci*, 1972; 203: 212.
20. Mooradian AD, Wong NCW. *Molecular Biology of Aging Part II: A Synopsis of Current Research*. JAGS 1991; 39: 717-723.
21. Stevens VJ, Vlassara H, Abati A, Cerami A: Nonenzymatic glycosilation of haemoglobin. *J Biol Chem* 1977; 252: 2998-3002.
22. Vassara H, Brownlee M, Cerami A: High affinity receptor-mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins. A potential mechanism for the removal of senescent molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985; 82: 5588-5592.
23. Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Nonenzymatic glycosilation products on collagen covalently trap lowdensity lipoprotein. *Diabetes* 1985; 34: 938-941.
24. Monnier VM, Cerami A: Detection of nonenzymatic browning products in the human lens. *Biochem Biophys Acta* 1983; 760: 97-103.
25. Scheneider SL, Kohn RR. Glycosilation of human collagen in aging and diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1980; 66: 1179-1181.
26. Master PM. Aminoacid racemization in structural proteins. In: Reff ME, Schneider EL Eds. *Biological markers of aging*. NIH Publication No. 82: 1982; 2221 pp 120-137.
27. Man EH, Sandhouse ME, Burg J, Fisher GH: Accumulation of D-aspartic acid with age in the human brain. *Science*, 1983; 220: 1407-1408.
28. Maters PM, Bada JL, Zigler J: Aspartic acid racemization in the human lens during aging and in cataract formation. *Nature* 1977; 268: 71-73.
29. Richardson A, Birchenall-Sparks MC. Age related changes in protein synthesis. *Rev Biol Res Aging* 1983; 1: 255-273.
30. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965; 37: 614-636.
31. Praeger B. In vitro studies of aging. *Dermatologic Clinics* 1986; 4(3): 359-369.
32. Richardson A, Rutherford MS, Birchenall-Sparks MC et al. In: Sohal RS, Birnbaum LS, Cutler RG, Ed. *Molecular Biology of aging. Gene stability and gene expression*. New York: Raven Press 1980 pp 229.
33. Muller WEG, Agutter PS, Bernd A, et al. Role of postranscriptional events in aging: Consequences for gene expression in eukaryotic cells. In: M. Bergener, M. Ermini, HB Stahelin, eds. *The 1984 Sandoz Lectures in Gerontology, Thresholds in Aging*. London: Academic Press, p 21, 1985.
34. Zhelabovskaya SM, Berdyshev GD. Composition, template activity and thermostability of the liver chromatin in rats of various age. *Exp Gerontol* 1972; 7: 313-320.
35. Chetsanga CJ, Boyd V, Peterson L, Rushlow K. Single-stranded regions in DNA of old mice. *Nature*, 1975; 253: 130-131.
36. Dean RG, Cutler RG. Absence of significant age-dependent in crease of single-stranded DNA extracted from mouse liver nuclei. *Exp Gerontol* 1978; 13: 287-292.
37. Ishikawa T, Sakurai J, Takayama S. In vivo studies on DNA repair and turnover with age. In: AD Woodhead, AD Blackett A Hollander, eds. *Molecular Biology of Aging*. New York: Plenum Press, 297-313, 1984.
38. Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, and Tanaka M: Mitochondrial and DNA mutations as an important contributor to aging and degenerative diseases. *Lancet*, 1989; 1: 642-645.
39. Linnane AW, Baumer A, Maxwell RJ, Preston J, Zhang C, and Marzuki S: Mitochondrial gene mutation: The aging process and degenerative diseases. *Biochem Int* 1990; 22: 1067-1076.
40. Lumpkin CK, McClung JK, Pereira-Smith OM, Smith JR. Existence of high abundance antiproliferative mRNAs in senescent human diploid fibroblasts. *Science* 1986; 232: 393-395.
41. Seshadri T, Campisi J. Repression of c-fos transcription and an altered generic program in senescent human fibroblast. *Science* 1990; 247: 205-209.
42. Stein GH, Beeson M, Gordon L. Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senescent human fibroblasts. *Science* 1990; 249: 666-669.
43. Maier JAM, Voulalas P, Roeder D, Maciag T. Extension of the life-span of human endothelial cells by an interleukin-1 α antisense oligomer. *Science* 1990; 249: 1570-1574.
44. Lockshin RA, Zakeri ZF. Programmed cell death: new thoughts and relevance to aging. *J Gerontol* 1990; 45: B135-B140.
45. Sugawara O, Oshimura M, Koi M, et al. Induction of cellular senescence in immortalized cells by human chromosome 1. *Science* 1990; 247: 707-710.